

05.3.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

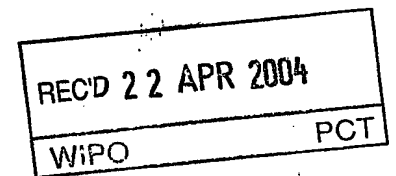
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 3月19日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-075964  
[ST. 10/C]: [JP2003-075964]

出 願 人  
Applicant(s): 株式会社ディナベック研究所

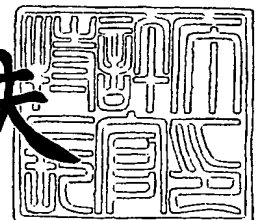


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月 9日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 D3-A0206

【提出日】 平成15年 3月19日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/63

A61P 19/00

【発明者】

【住所又は居所】 福岡県福岡市南区大池 1 - 2 9 - 2 2

【氏名】 居石 克夫

【発明者】

【住所又は居所】 福岡県福岡市東区名島 5 - 3 1 - 3

【氏名】 米満 吉和

【発明者】

【住所又は居所】 福岡県糟屋郡粕屋町長者原 3 2 9 C 棟 2 0 2

【氏名】 山下 彰久

【発明者】

【住所又は居所】 福岡県久留米市小森野 2 - 7 - 2

【氏名】 吉村 昭彦

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号 株式会社デ  
イナベック研究所内

【氏名】 長谷川 護

【特許出願人】

【識別番号】 595155107

【氏名又は名称】 株式会社デイナベック研究所

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716812

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 骨破壊を伴う炎症性疾患の治療方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 骨破壊を伴う炎症性疾患の治療方法であって、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF2)-FGF受容体1-Ras-Raf-MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する蛋白質または核酸をコードするベクターを投与する工程を含む方法。

【請求項 2】 ベクターが一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 該シグナル伝達を阻害する蛋白質が、可溶性FGF受容体、sprouty-2、およびspredからなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】 該疾患が関節リウマチである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】 骨破壊を伴う炎症性疾患の治療組成物であって、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF2)-FGF受容体1-Ras-Raf-MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する蛋白質または核酸をコードするベクター、および薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項 7】 ベクターが一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターである、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】 一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】 該シグナル伝達を阻害する蛋白質が、可溶性FGF受容体、sprouty-2、およびspredからなる群より選択される、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 10】 該疾患が関節リウマチである、請求項 6 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、線維芽細胞増殖因子-2 (fibroblast growth factor-2: FGF2) の機能制御、及びその細胞内信号伝達系の遮断により骨破壊を伴う炎症性疾患を治療

する方法に関する。本発明の方法は、特に関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA) の治療に有用である。

## 【0002】

### 【従来の技術】

これまでの世界的医学研究によりRAに対する種々の治療戦略および疾患修飾性抗リウマチ剤 (disease modifying anti-rheumatoid drugs: DMARDs) が開発されてきた。RA治療に関する従来の主要な技術 (RA治療戦略) を以下に列挙する。これらはRAに対する生物学的作用薬を用いた治療及びその治療戦略である。

## 【0003】

### ① 腫瘍壊死因子 (tumor necrotic factor: TNF) 制御による治療法

可溶性TNF受容体 (Moreland, L.W. et al., N. Engl. J. Med. 337:141-147 (1997); Bathon, J.M. et al., N. Engl. J. Med. 343:1586-1593 (2000)) または抗TNF- $\alpha$ 抗体 (Maini, R.N. et al., Ann. Rheum. Dis. 58:I56-I60 (1999); Lipsky, P.E. et al., N. Engl. J. Med. 343:1594-1602 (2000); Maini, R.N. et al., Lancet 354:1932-1939 (1999)) を用いてTNF- $\alpha$ の機能制御によりRAを治療する抗サイトカイン療法である。

### ② インターロイキン-1 (interleukin-1: IL-1) 制御による治療法

IL-1レセプターアンタゴニストを用いてIL-1の機能制御によりRAを治療する抗サイトカイン療法である (Cohen, S. et al., Arthritis Rheum. 46:614-624 (2002))。

### ③ IL-6制御による治療法

抗IL-6受容体モノクローナル抗体を用いてIL-6の機能制御によりRAを治療する抗サイトカイン療法である (Nishimoto, N. et al., Ann. Rheum. Dis. 59:I21-I27 (2000))。

### ④ VEGF機能制御による治療法

可溶性VEGF受容体 (Miotla, J. et al., Lab. Invest., 80:1195-205 (2000)) または抗VEGF抗体 (Lu, J. et al., J. Immunol. 164:5922-7 (2000); Sone, H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 281:562-8 (2001)) を用いてVEGFの機能を阻害することによってRAを治療する抗サイトカイン療法である。

## 【 0 0 0 4 】

しかし、これらの従来技術には幾つか問題点が存在する。主要な問題点としては、例えば最終的に骨関節破壊を免れることは困難であることが挙げられる。すなわち、従来の治療法及び薬剤では滑膜炎抑制に基づく自他覚症状の緩和という面においては治療効果が認められるものの、骨関節破壊の直接的抑制効果に乏しく、炎症抑制に起因すると考えられる骨破壊進展遅延作用を認めるのみで最終的に骨関節破壊を免れることは困難である。また、キメラ型中和抗体を用いた治療法においては、中和抗体に対するヒト抗キメラ抗体産生に伴う効果の減弱が認められ、臨床的にはメソトレキセートなどの免疫抑制剤との併用を余儀なくされる。更に、炎症性サイトカインを標的とした抗サイトカイン療法および生物学的作用薬の全身投与法においては非罹患諸臓器に与える影響の面で種々の予期せぬ副作用を来す可能性が十分考えられる。

## 【 0 0 0 5 】

## 【非特許文献 1】

Moreland, L.W. et al., N. Engl. J. Med. 337:141-147 (1997)

## 【非特許文献 2】

Bathon, J.M. et al., N. Engl. J. Med. 343:1586-1593 (2000)

## 【非特許文献 3】

Maini, R.N. et al., Ann. Rheum. Dis. 58:I56-I60 (1999)

## 【非特許文献 4】

Lipsky, P.E. et al., N. Engl. J. Med. 343:1594-1602 (2000)

## 【非特許文献 5】

Maini, R.N. et al., Lancet 354:1932-1939 (1999)

## 【非特許文献 6】

Cohen, S. et al., Arthritis Rheum. 46:614-624 (2002)

## 【非特許文献 7】

Nishimoto, N. et al., Ann. Rheum. Dis. 59:I21-I27 (2000)

## 【非特許文献 8】

Miotla, J. et al., Lab. Invest., 80:1195-205 (2000)

## 【非特許文献 9】

Lu, J. et al., J. Immunol. 164:5922-7 (2000)

## 【非特許文献 10】

Sone, H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 281:562-8 (2001)

## 【0006】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、FGF2の機能を阻害、またはその細胞内信号伝達系を遮断することによる、骨破壊を伴う炎症性疾患の治療方法を提供する。また本発明は、FGF2の機能を阻害、またはその細胞内信号伝達系を遮断する蛋白質をコードするベクターを含む、該疾患の治療組成物を提供する。

## 【0007】

## 【課題を解決するための手段】

FGF2は細胞の分化および発生に重要な役割を果たす増殖因子である (Klagsbrun, M., 1989, Prog. Growth Factor Res. 1:207-235; Mason, I., 1994, Cell 78:547-552; Bikfalvi, A. et al., 1997, Endocr. Rev. 18:26-45)。FGF2はFGF受容体 (FGFR) を介して正常の発生過程および組織再生に重要な役割を果たしている他、癌増殖および炎症などにも関与する (Basilico, C. and Moscatelli, D., 1992, Adv. Cancer Res. 59:115-165; Klein, S et al., 1997, Experientia Suppl. 79:159-192; Jackson, J. et al., 1997, FASEB J. 11:457-465)。また、線維芽細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、表皮細胞などの細胞増殖を促進し、血管新生、骨・軟骨形成、および創傷治癒などにおける調節因子としても作用する (Marie, P. et al., 2000, Joint Bone Spine 67:150-156; Boyce, B. et al., 1999, Lab. Invest. 79:83-94; Goldfarb, M. 1996, Cytokine Growth Factor Rev. 7:311-325; Chikazu, D. et al., 2000, J. Biol. Chem. 275:31444-31450; Yamashita, A. et al., 2002, J. Immunol. 168:450-457; Collon-Osdoby, P. et al., 2002, J. Bone Mineral Res. 17:1859-1871)。FGF2は、FGFR1 IIIb、FGFR1 IIIc、FGFR2 IIIc、FGFR3 IIIc、およびFGFR4 に結合することが知られている (Ornitz et al., 1996, J. Biol. Chem., 271:15292-15297)。FGF2がFGFRに結合すると、FGFRのチロシンリン酸化活性により下流のシグナル分子がリン酸化

され、Ras、Raf-1、MAPKK、MAPKへとシグナルが伝達される。本発明者らは、このシグナル伝達を阻害する遺伝子を発現するベクターによりシグナル伝達を阻害する遺伝子治療を、炎症性骨疾患に対して適用することを考えた。

#### 【0008】

そこで本発明者らは、FGF2の機能を阻害する分泌型FGF受容体、並びにFGF2の細胞内信号伝達系を遮断するsprouty-2およびspredをコードするウイルスベクターを作製し、RAモデルラットの疾患関節に投与する遺伝子治療を行なった。その結果、これらのうちいずれのベクターの投与においても関節の炎症が有意に抑制され、さらに該ベクターを投与した関節では、骨量の減少が緩和され、有意な治療効果を認めた。このように、FGF2の機能阻害またはその細胞内信号伝達系の遮断する蛋白質を発現するベクターを骨疾患部位に局所投与することによって、疾患部位の炎症を抑えると同時に骨破壊も抑制し、症状を有意に改善することに成功した。RAなどの骨破壊を伴う炎症性疾患においては、これまで効果的な治療方法がなかったが、本発明の方法に従った遺伝子治療により、患部の炎症と骨破壊を同時に抑制できる新しい治療が可能となった。ベクターを患部に局所投与すれば、全身投与における副作用を回避することができ、さらにベクターからのシグナル伝達阻害因子の発現により、長期間にわたって治療効果を持続することが可能である。

#### 【0009】

すなわち本発明は、FGF2の機能阻害またはその細胞内信号伝達系の遮断により骨破壊を伴う炎症性疾患を治療する方法、および該治療に用いる医薬組成物に関し、より具体的には、

- (1) 骨破壊を伴う炎症性疾患の治療方法であって、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF2) - FGF受容体1 - Ras - Raf - MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する蛋白質または核酸をコードするベクターを投与する工程を含む方法、
- (2) ベクターが一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターである、(1)に記載の方法、
- (3) 一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、(2)に記載の方法、



- (4) 該シグナル伝達を阻害する蛋白質が、可溶性FGF受容体、sprouty-2、およびspredからなる群より選択される、(1)に記載の方法、
- (5) 該疾患が関節リウマチである、(1)に記載の方法、
- (6) 骨破壊を伴う炎症性疾患の治療組成物であって、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF2)-FGF受容体1-Ras-Raf-MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する蛋白質または核酸をコードするベクター、および薬学的に許容される担体を含む組成物、
- (7) ベクターが一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターである、(6)に記載の組成物、
- (8) 一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、(7)に記載の組成物、
- (9) 該シグナル伝達を阻害する蛋白質が、可溶性FGF受容体、sprouty-2、およびspredからなる群より選択される、(6)に記載の組成物、
- (10) 該疾患が関節リウマチである、(6)に記載の組成物、に関する。

#### 【0010】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、骨疾患における炎症と骨破壊の一元的治療に対して、FGF2の機能制御、及びその細胞内信号伝達系の遮断によりRAを治療する方法を提供する。つまり、本発明者らは、FGF2-FGF受容体1-Ras-Raf-MAPキナーゼ系を介した一連のFGF2シグナル伝達系の細胞外および/または細胞内における阻害を治療戦略として提供した。FGF2シグナル伝達系を阻害する因子をコードするベクターを患部に投与することにより、患部の炎症と骨破壊とを同時に抑制することができる。FGF2はその受容体 (FGFR) に結合すると二量体を形成し、チロシンの自己リン酸化が誘導され活性化される。活性化したFGFRチロシンキナーゼはSrcキナーゼ、ホスホリパーゼC $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) 等の酵素の他、Shc、FGF receptor substrate 2 (FRS2) などのアダプター蛋白質のチロシンをリン酸化する。リン酸化されたShcおよびFRS2はGrb2と結合し、Sosを細胞膜へリクルートし、SosによってRasが活性化される。活性型RasはRaf-1キナーゼと結合し、MAPKキナーゼを活性化、さらにMAPキナーゼが活性化される。FRS2にはSHP2というチロシンホスファターゼが結

合する。FGF2-FGF受容体1-Ras-Raf-MAPキナーゼを介するシグナル伝達とは、上記に示したFGF2からMAPKに至るシグナル伝達である。このシグナル伝達の阻害とは、例えばFGF2から、FGF受容体1、Ras、Raf、およびMAPキナーゼへと至るシグナル伝達の1つまたはそれ以上の所望のポイントを阻害することである。例えばFGF2、FGF受容体1、Shc、Grb2、Sos、FRS2、SHP2、Ras、Raf、MAPKK、およびMAPKの活性（他のシグナル分子との相互作用またはリン酸化活性など）を阻害することであってよい。また、各シグナル分子の発現（転写、翻訳、またはmRNA・蛋白質の安定性など）を阻害することであってよい。

#### 【0011】

FGF2-FGF受容体1-Ras-Raf-MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する蛋白質または核酸としては、例えばこのシグナル伝達に関与する分子に対するアンチセンス核酸、RNA干渉（RNAi）効果を有するRNA、リボザイム、または抗体などが挙げられる。アンチセンス核酸としては、シグナル分子をコードする遺伝子のセンス鎖の連続した13ヌクレオチド以上、好ましくは14ヌクレオチド以上、さらに好ましくは15ヌクレオチド以上、さらに好ましくは20ヌクレオチド以上に対するアンチセンス配列を含む核酸が挙げられる。例えば、初期転写配列中のエクソン-イントロン境界、イントロン-エクソン境界、翻訳開始コドンを含む領域、または成熟mRNA中の蛋白質コード配列に対するアンチセンス配列を含む核酸などが好ましい。また、リボザイムとしては、標的遺伝子のmRNAを切断するRNA切断型リボザイムを利用できる。たとえば、ハンマーヘッド型リボザイム（Rossi et al. (1991) *Pharmac. Ther.* 50: 245-254）およびヘアピン型のリボザイム（Hampel et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18: 299-304, and U.S. Pat. No. 5,254,678）が、塩基配列特異的な切断作用を有することが知られている。これらのリボザイムは、アンチセンス配列がハイブリダイズするポリヌクレオチドの特定の位置を、その触媒作用によって切断することができる。またシグナル伝達を阻害する抗体としては、シグナル分子の活性に重要なドメイン、例えばリン酸化部位または他のシグナル分子との相互作用部位に結合する抗体が用いられる。

#### 【0012】

また、本発明においてさらに好ましい態様では、FGF2-FGF受容体1-Ras-Raf

—MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する蛋白質成分をベクターから発現させる。好ましい手段としては、大きく、①可溶性FGF受容体遺伝子を用いたシグナル伝達の阻害、②細胞内シグナル伝達系（Ras-Raf-MAPキナーゼ系）を阻害する遺伝子を用いた阻害の二通りが挙げられる。発明の実施形態として具体的に以下に述べる。

### 【0013】

#### 1. 可溶性FGF受容体遺伝子を用いた遺伝子治療

現在までの諸家の研究により、滑膜組織においてはFGF受容体1から受容体4が、破骨細胞においては受容体1のみが発現していること、また、破骨細胞の分化および生物学的機能発現においてFGF受容体1-MAPK (p42/p44MAPK) を介したシグナル伝達が重要であることが報告されている。本発明の好ましい態様では、ヒト可溶性FGF受容体 (human soluble FGF receptor: hsFGFR) 遺伝子をベクターにより直接的に滑膜組織に導入する遺伝子治療法によりFGF2を細胞外で機能阻害する。可溶性FGF受容体とは、FGF受容体の細胞外ドメインにあるFGF2結合ドメインを含む蛋白質であって、細胞で発現させることにより細胞外に分泌される蛋白質である。分泌蛋白質をコードする核酸は、FGF受容体遺伝子の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインをコードする核酸を欠失させることにより得られる。細胞外に分泌された可溶性FGF受容体は、FGF2と結合し、FGF2と内因性FGFR-1との結合と干渉することによりFGF2のシグナル伝達を阻害する。可溶性FGF受容体遺伝子を組み込んだベクターを骨破壊部位に投与することにより、炎症と骨破壊を抑制する顕著な効果が得られる。可溶性FGF受容体としては、FGF2と結合するFGF受容体のFGF2結合部位を含む分泌型蛋白質であればよく、天然の蛋白質および遺伝子組み換えにより人為的に作り出した蛋白質が含まれる。具体的には、例えばFGFR1a IIIb (Accession NM\_015850, NP\_056934, AAB19502, Isacchi, A. et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18:1906; Johnson, D.E. et al., 1991, Mol. Cell Biol. 11:4627-4634)、FGFR1b(IIIb) (Accession NM\_023106, NP\_075594, AAB19502, Isacchi, A. et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18:1906; Johnson, D.E. et al., 1991, Mol. Cell Biol. 11:4627-4634)、FGFR1a(IIIc) (Accession NM\_015850, NP\_056934, AAB19502, Isacchi, A. et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18:1906; Johnson, D.E. et al., 1991, Mol. Cell Biol. 11:4627-4634)。

ds Res. 18:1906)、FGFR1b(IIIc) (Accession NM\_023106, NP\_075594, AAB19502, Isacchi, A. et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18:1906)、FGFR2(IIIc) (Accession NM\_022962, NP\_075251, Johnson, D.E. et al., 1991, Mol. Cell. Biol. 11:4627-4634)、FGFR3(IIIc) (Accession P22607, Keegan, K. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:1095-1099)、FGFR4 (Accession AAB25788, Ron, D. et al., 1993, J. Biol. Chem. 268:5388-5394) の細胞外ドメインを含む分泌型蛋白質が挙げられる。特に好ましくは、スプライシングバリエントとして自然界に存在し、なおかつFGF-2の天然のインヒビターとしての作用を有するFGFR1 IIIa、およびヒト線維芽細胞増殖因子受容体分泌型 (human fibroblast growth factor receptor (FGFr) secreted form) などが挙げられる。例えばFGFr分泌型遺伝子の塩基配列 (配列番号: 1) はAccession number M34188、アミノ酸配列 (配列番号: 2) はprotein ID AAA35839に示されている (Johnson, D.E. et al., Mol. Cell. Biol. 10 (9), 4728-4736 (1990))。

#### 【0014】

#### 2. 細胞内シグナル伝達系の阻害による治療

sprouty-2およびsprouty関連Rasシグナル抑制因子であるspredはRasに結合し、Rafのリン酸化と活性化を妨害してMAPキナーゼの活性化を抑制することでFGF受容体と上皮増殖因子 (epidermal growth factor: EGF) 受容体の生理作用を調節している。このsprouty-2またはspred遺伝子を遺伝子治療により滑膜組織および/または周囲の骨格筋に導入、局所で発現させることによりFGF2分子を介した滑膜炎ならびに破骨細胞性骨吸収を抑制し治療効果を発揮する。sprouty 2 [Homo sapiens] の塩基配列 (配列番号: 3) およびアミノ酸配列 (配列番号: 4) はAccession number NM\_005842およびNP\_005833に、Spred-2 [Mus musculus] の塩基配列 (配列番号: 5) およびアミノ酸配列 (配列番号: 6) はAccession number AB063496およびBAB62849に示されている (Hacohen, N. et al., Cell 92 (2), 253-263 (1998); Glienke, J. et al., Mech. Dev. 96 (1), 91-99 (2000); Lim, J. et al., J. Biol. Chem. 275 (42), 32837-32845 (2000); Wong, E. S. et al., J. Biol. Chem. 276 (8), 5866-5875 (2001); Yusoff, P. et al., J. Biol. Chem. 277 (5), 3195-3201 (2002); Egan, J.E. et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. U.S.A. 99 (9), 6041-6046 (2002); Wakioka, T. et al., Nature 412 (6847), 647-651 (2001))。また、Ras/Raf/MEK/MAPKを介したFGFシグナル伝達系のアンタゴニストとして作用するSef (similar expression to fgf genes) を用いることができる (Furthauer M, et al., Nat. Cell Biol., 2002, 4(2):170-4)。また、fgf8、fgf3、sprouty4なども利用し得る。

#### 【0015】

また、上記した可溶性FGFR、およびFGFRの細胞内シグナル伝達の阻害蛋白質は、天然のアミノ酸を改変したものをを用いることができる。具体的には、天然の可溶性FGFRまたはFGFRの細胞内シグナル伝達の阻害蛋白質のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、および/または付加したアミノ酸配列を含む蛋白質、天然の可溶性FGFRまたはFGFRの細胞内シグナル伝達の阻害蛋白質と70%以上、好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ配列を含む蛋白質、ならびに天然の可溶性FGFRまたはFGFRの細胞内シグナル伝達の阻害蛋白質のコード領域の一部または全部を含む核酸とストリンジェントな条件でハイブリダイズする核酸がコードする蛋白質であって、FGF2-FGF受容体1-Ras-Raf-MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する蛋白質は本発明において好適に用いることができる。例えば可溶性FGFRであれば、FGF2と結合する活性を有している分泌蛋白質であれば所望の変異を有していてもよい。またsprouty 2またはSpredの変異体であれば、Rafのリン酸化を阻害する活性を持つものであれば本発明において利用することができる。

#### 【0016】

アミノ酸の置換、欠失、および/または付加においては、改変されるアミノ酸数は、通常15以内、好ましくは11以内、より好ましくは9以内、より好ましくは7以内、より好ましくは5以内である。特にアミノ酸を保存的に置換した蛋白質は活性が維持されやすい。保存的置換は、例えば塩基性アミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性アミノ酸（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性アミノ酸（例えばアラニン、

バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 $\beta$ 分岐アミノ酸(例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族アミノ酸(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)などの各グループ内のアミノ酸間の置換などが挙げられる。アミノ酸配列の同一性は、例えばBLASTPプログラム(Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410)を用いて決定することができる。具体的にはblastpプログラムを用いることができる。例えばNCBI(National Center for Biotechnology Information)のBLASTのウェブページにおいてLow complexityを含むフィルターは全てOFFにして、デフォルトのパラメータを用いて検索を行う(Altschul, S.F. et al. (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L. et al. (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) Genome Res. 7: 649-656)。例えば2つの配列の比較を行うblast2sequencesプログラム(Tatiana A et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250)により、2配列のアライメントを作成し、配列の同一性を決定することができる。ギャップはミスマッチと同様に扱い、例えば天然の可溶性FGFRまたはFGFRの細胞内シグナル伝達の阻害蛋白質のアミノ酸配列全体に対する同一性の値を計算する。また、ハイブリダイゼーションにおいては、天然の可溶性FGFRまたはFGFRの細胞内シグナル伝達の阻害蛋白質のコード配列を含む核酸、またはハイブリダイズの対象とする核酸のどちらかからプローブを調製し、それが他方の核酸にハイブリダイズするかを検出することにより同定することができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は、例えば5×SSC、7%(W/V) SDS、100 $\mu$ g/ml 変性サケ精子DNA、5×デンハルト液(1×デンハルト溶液は0.2%ポリビニールピロリドン、0.2%牛血清アルブミン、および0.2%フィコールを含む)を含む溶液中、48℃、好ましくは50℃、より好ましくは52℃でハイブリダイゼーションを行い、その後ハイブリダイゼーションと同じ温度、より好ましくは60℃、さらにこの好ましくは65℃、最も好ましくは68℃で2×SSC中、好ましくは1×SSC中、より好ましくは0.5×SSC中、より好ましくは0.1×SSC中で、振盪しながら2時間洗浄する条件である。

【0017】

上記のシグナル伝達を阻害する核酸または蛋白質の遺伝子を組み込むベクターとしては、ウイルスベクター、およびプラスミドベクター等のnaked DNA（裸のDNA）など所望のベクター系を用いることができるが、ウイルスベクターが特に好適である。ウイルスベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、フォウルポックスウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどが挙げられる。これらのウイルスベクターは、遺伝子工学的に組み換えウイルスベクターとして調製することができる。

#### 【0018】

「組み換え」ウイルスベクターとは、組み換えポリヌクレオチドを介して生成したウイルスベクターまたはそれを増幅して得られるウイルスベクターである。なお、組み換えポリヌクレオチドとは、ポリヌクレオチドの両端が自然の状態と同じようには配置していないポリヌクレオチドを言う。より具体的には、例えば人為的にポリヌクレオチド鎖が繋ぎ替えられたり、あるいは新たに生成されたポリヌクレオチドである。組み換えポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド合成、ヌクレアーゼ処理、リガーゼ処理等を組み合わせて、公知の遺伝子組み換え方法により生成させることができる。

#### 【0019】

組み換えウイルスベクターは当業者に周知の方法に従って調製することができる。例えば、遺伝子治療などに最も普通に利用されるアデノウイルスベクターの作製は、斎藤らの方法および他（Miyakeら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻、1320-24頁；Kanegaeら、1996、Acta Paediatr. Jpn、38巻、182-188頁；鐘ヶ江ら、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、1994、43-58頁、羊土社；鐘ヶ江ら、1994、細胞工学、13巻、8号、757-763頁）に従って製造することができる。また、例えばレトロウイルスベクター（脇本ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、2508-2513頁）、およびアデノ随伴ウイルスベクター（玉寄ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、2532-2538頁）なども、公知の方法により調製することができる。哺乳動物に遺伝子導入可能なその他のウイルスベクター

を製造するための詳細は、組換えワクシニアウイルスを製造する方法としては、特表平6-502069、特公平6-95937、特公平6-71429が知られている。組換えパピローマウイルスを製造する方法としては特公平6-34727、特表平6-505626が知られている。組換えアデノ随伴ウイルスを製造する方法としては、特開平5-308975が知られている。組換えアデノウイルスを製造する方法としては、特表平6-508039が知られている。

#### 【0020】

ウイルスベクターの中でも、本発明において特に好適なベクターは一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターである。一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスベクターとは、一本鎖のネガティブ鎖 [すなわち(-)鎖] RNAをゲノムに有するウイルスまたはその誘導体であって、遺伝子を宿主細胞に導入するベクター (担体) を言う。一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスとしては、パラミクソウイルス (Paramyxoviridae; Paramyxovirus, Morbillivirus, Rubulavirus, および Pneumovirus属等を含む)、ラブドウイルス (Rhabdoviridae; Vesiculovirus, Lyssavirus, および Ephemerovirus属等を含む)、フィロウイルス (Firoviridae)、オルトミクソウイルス (Orthomyxoviridae; Influenza virus A, B, C, および Thogoto-like viruses 等を含む)、ブニヤウイルス (Bunyaviridae; Bunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, および Phlebovirus属等を含む)、アレナウイルス (Arenaviridae) などの科に属するウイルスが含まれる。特に好ましくは、パラミクソウイルス科のウイルスベクター (本明細書においてこれをパラミクソウイルスベクターと言う) が用いられる。本発明者らは、FGF2シグナルの阻害因子をコードするパラミクソウイルスベクターの投与が、骨破壊性関節炎の炎症および骨量の減少の両方を顕著に低下させることを実証した。パラミクソウイルスベクターは染色体非組み込み型のRNAウイルスベクターであり、外来遺伝子を一定期間、非常に高いレベルで発現させる特性を持つ。このようなベクターの特性が、本発明の方法における骨破壊性炎症疾患の治療にとって特に好ましい作用を及ぼしたと考えられる。

#### 【0021】

本発明に用いられ得るパラミクソウイルスとしては、例えばパラミクソウイル



ス科 (Paramyxoviridae) のセンダイウイルス (Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス (Mumps virus)、麻疹ウイルス (Measles virus)、RSウイルス (Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス (rinderpest virus)、ジステンパーウイルス (distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス (SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス1, 2, 3型等が挙げられる。本発明においてパラミクソウイルスは、好ましくはパラミクソウイルス亜科 (Paramyxovirinae) (レスピロウイルス属、ルブラウイルス属、およびモービリウイルス属を含む) に属するウイルス、より好ましくはレスピロウイルス属 (Respirovirus) (パラミクソウイルス属 (Paramyxovirus) とも言う) に属するウイルスまたはその誘導体である。本発明に用いられ得るレスピロウイルス属ウイルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウイルス1型 (HPIV-1)、ヒトパラインフルエンザウイルス3型 (HPIV-3)、ウシパラインフルエンザウイルス3型 (BPIV-3)、センダイウイルス (Sendai virus; マウスパラインフルエンザウイルス1型とも呼ばれる)、およびサルパラインフルエンザウイルス10型 (SPIV-10) などが含まれる。本発明においてパラミクソウイルスは、最も好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などであり得る。DI粒子 (J. Virol. 68, 8413-8417(1994)) 等の不完全ウイルスまたは合成したオリゴヌクレオチド等も、ウイルスベクターを製造するための材料として使用することができる。

#### 【0022】

組み換えネガティブ鎖RNAウイルスベクターは、ウイルスゲノムをコードするDNAに適当な転写プロモーターを連結した組み換えDNAを構築し、これを試験管内または細胞内で転写させ、ネガティブ鎖RNAウイルスのL、P、およびNPタンパク質の共存下でRNPを再構成させ、このRNPを含むウイルス粒子を形成させることにより生成させることができる。具体的には、通常、(a) ネガティブ鎖RNAウイルスに由来するネガティブ鎖一本鎖RNAまたはその相補鎖 (ポジティブ鎖) をコードするベクターDNAを、NP、P、およびL蛋白質を発現する細胞 (ヘルパー細胞) で転写させ、(b) 該細胞を培養し、その培養上清からウイルス粒子を回収す

ることにより調製することができる。ベクターDNAから転写されたRNAは NP、L、およびPタンパク質とRNP複合体を形成し、さらにエンベロープ蛋白質を含む外殻に包まれたウイルス粒子が形成する。ウイルスベクターDNAからのウイルスの再構成は公知の方法に従って行うことができる (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587; Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466; 国際公開97/16539号; 国際公開97/16538号; Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404)。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダイウイルスなどを含む所望のパラミクソウイルスベクターおよびその他の(-)鎖RNAウイルスベクターをDNAから再構成させることができる。ネガティブ鎖RNAウイルスは発現される蛋白質量が極めて高く、遺伝子導入可能な細胞種も極めて広い。また、特にセンダイウイルス (SeV) は霊長類において重篤な有害作用を示さず、本発明においてヒトへの遺伝子治療の臨床試験に好適に用いられる (Hurwitz, J. L. et al., Vaccine 15: 533-540, 1997)。

### 【0023】

ウイルスベクターは、野生型ウイルスの誘導体であってもよい。誘導体とは、ウイルスの遺伝子導入能を完全には損なわないように、ベクターが搭載するウイルス遺伝子またはウイルス蛋白質を改変したベクターを言う。このような改変は、ベクターの複製能を破壊したり、あるいは抗原性を減弱化したりするために行い得る。例えばウイルスの複製に必須の遺伝子を欠損させた複製能欠損型ウイルスベクターを用いることができる。パラミクソウイルスベクターDNAにおいては、F遺伝子および/またはHN遺伝子等を欠失させた場合には、そのままでは感染性

のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることが可能である。このような欠失型ウイルスベクターの製造方法は公知であり、これに従ってまたは順じて製造することができる（国際公開番号 W000/70055 および W000/70070参照）。ベクターからの外来遺伝子の発現量は、例えば、その遺伝子上流に付加する転写開始配列の種類により調節することができる（国際公開番号 W001/18223）。また、ウイルスベクターは、このウイルス以外に由来するエンベロープ蛋白質を含むシュードタイプウイルスベクターであってもよい。このようなエンベロープ蛋白質には、VSV-Gなどが挙げられる（国際公開番号 W000/70055 および W000/70070参照）。

#### 【0024】

またウイルスが持つアクセサリー遺伝子を欠損させてもよい。例えばSeVのアクセサリー遺伝子の1つであるV遺伝子をノックアウトすることにより、培養細胞における遺伝子発現および複製は障害されることなく、マウス等の宿主に対するSeVの病原性が顕著に減少する（Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71:7266-7272; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16:578-587; Curran, J. et al., W001/04272, EP1067179）。このような弱毒化ベクターは、in vivo またはex vivoにおける毒性のない遺伝子導入用ウイルスベクターとして特に有用である。

#### 【0025】

回収したウイルスベクターは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法はフィルトレーション（濾過）、遠心分離、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、ウイルスベクターが、それが存在する試料中の成分として主要な割合を占めることを言う。典型的には、実質的に純粋なウイルスベクターは、試料中に含まれる全蛋白質（但しキャリアーおよび安定剤として加えた蛋白質は除く）のうち、ウイルスベクター由来の蛋白質の割合が10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。パラミク

ソウウイルスの具体的な精製方法としては、例えばセルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法（特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報）、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法（W097/32010）等を例示することができる。

#### 【0026】

ウイルスの力価は、例えばCIU (Cell-Infected Unit) 測定または赤血球凝集活性(HA)の測定することにより決定することができる（W000/70070; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999; Kiyotani, K. et al., Virology 177(1), 65-74 (1990)）。また、GFP（緑色蛍光蛋白質）などのマーカー遺伝子を搭載したベクターについては、マーカーを指標に直接的に感染細胞をカウントすることにより力価を定量することができる（例えばGFP-CIUとして）。このようにして測定した力価は、CIUと同等に扱うことができる（W000/70070）。得られたベクターは、骨破壊を伴う炎症性疾患に対する予防剤および治療剤となる。特に上記のベクターは、関節リウマチの予防剤または治療剤として有用である。

#### 【0027】

ウイルスベクターを含む組成物の製造においては、ベクターは必要に応じて薬学的に許容される所望の担体または媒体と組み合わせることができる。「薬学的に許容される担体または媒体」とは、ベクターと共に投与することが可能であり、ベクターによる遺伝子導入を有意に阻害しない材料である。具体的には、例えば滅菌水、生理食塩水、培養液、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）などと適宜組み合わせることで製剤化することが考えられる。さらに、その他にも、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。本発明の組成物は、水溶液、カプセル、懸濁液、シロップなどの形態であり得る。本発明の方法で製造されたウイルスベクターを含む組成物は試薬または医薬として有用である。

該組成物は、例えば、破骨細胞形成を抑制するための試薬および医薬として、骨破壊および／または炎症を抑制するための試薬および医薬として、または骨破壊疾患を予防または治療するための医薬として用いられる。

#### 【0028】

上記のように製造したベクターを骨破壊を伴う炎症性疾患患者の患部に投与することにより、症状を著しく軽減させることができる。ここで「骨破壊を伴う炎症性疾患」とは、骨の破壊、減少、吸収、および／または粗鬆化と炎症とを伴う疾患を言う。このような疾患としては、特に関節リウマチ (RA) が挙げられる。本発明の方法を用いて、関節リウマチの炎症および骨破壊を抑制することができる。その他にも、若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎、種々の膠原病に続発する多発性関節炎などの治療も本発明の対象となる。

#### 【0029】

RAは関節滑膜の持続的な炎症で、その増殖および肥厚の結果、関節軟骨およびその周囲の骨破壊により、関節の変形および骨破壊に到る慢性疾患である。本発明は、RAの滑膜炎および骨破壊の一元的治療に対して、FGF2の機能制御、及びその細胞内信号伝達系の遮断によりRAを治療する方法を提供する。つまり、本発明者らは、FGF2-FGF受容体1-Ras-Raf-MAPキナーゼ系を介した一連のFGF2シグナル伝達系の細胞外及び細胞内阻害をRAに対する治療戦略として提供した。

#### 【0030】

##### 1. RA滑膜炎の抑制について

RA滑膜病変の主体は増殖性滑膜炎である。この増殖性滑膜炎において(病的)血管新生という病態生理学的現象に因って形成された新生血管は、①滑膜組織への栄養分供給路、②炎症細胞の到達経路、③破骨細胞前駆細胞の到達経路、④サイトカインなどの疾患メディエーターの到達経路という面でRA病態形成及び進展、骨破壊において重要である。従って血管新生因子の機能制御によるRA治療戦略は合目的であり、滑膜における血管床の減少に伴って炎症が抑制されるものと考えられる。また、本発明は血管新生因子の中でもRAにおける炎症及び骨破壊の特異的増悪因子であるFGF2の機能制御を標的としていることから、より選択的かつ強力な抗滑膜炎作用を発揮するものと考えられる。

## 【0031】

## 2. RA骨破壊の抑制について

先にも述べたように、従来の技術では関節炎症と骨破壊を一元的かつ有効に治療することは困難であった。本発明における標的分子であるFGF2は、血管新生因子としての生物学的作用のみならず、骨破壊において中心的役割を担う破骨細胞の分化、機能促進因子であることも報告されている。従って、FGF2の機能制御により滑膜炎進展の抑制に留まらず、破骨細胞分化および機能を直接的に抑制することが可能であり、RA治療における究極の目標である滑膜炎、骨関節破壊という両現象の抑制が可能となる。

## 【0032】

## 3. ドラッグ・デリバリーシステムについて

RAに対して有効とされる蛋白製剤を経口的あるいは経静脈的に全身投与した場合、①関節滑膜局所への薬剤の到達、②局所における有効濃度の獲得、③全身諸臓器における副作用の発現、などの解決すべき重要な問題点が残される。一方、本発明による遺伝子治療法は、ベクターを用い滑膜組織に治療遺伝子を発現させることで、関節局所において有効な遺伝子発現レベルを一定期間持続的に獲得することが可能となる。この遺伝子治療技術を用いることで、蛋白が局所あるいは全身で高濃度になることを避けることが可能である。

## 【0033】

## 4. 生物学的創薬技術について

本発明はFGF2の機能を抑制する遺伝子、またはFGF2レセプター以降の細胞内シグナル伝達系を遮断する遺伝子が組み込まれたベクターを投与する方法を含む。つまり、細胞内シグナル伝達系における単一酵素の選択的阻害によって、より疾患・病態特異的な治療薬剤の製造及び治療が可能となる。このように本発明によって疾患特異的分子の選択的阻害という理想的な生物学的創薬が可能となる。

## 【0034】

ベクターの投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与組成物の形態、投与方法、導入遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。投与経路は適宜選択することができるが、骨破壊性の

炎症がある患部に特異的に到達するように、局所注入されるか、あるいは適当なドラッグデリバリーシステムにより患部に到達するように投与されることが好ましい。パラミクソウイルスベクターであれば、投与されるベクターの濃度は好ましくは約 $10^5$  CIU/mlから約 $10^{11}$  pfu/ml、より好ましくは約 $10^7$  CIU/mlから約 $10^9$  CIU/ml、最も好ましくは約 $1 \times 10^8$  CIU/mlから約 $5 \times 10^8$  CIU/mlの範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。投与量は、1箇所あたり好ましくは約 $10^5$  pfuから $10^{11}$  pfu、より好ましくは約 $10^7$  pfuから $10^9$  pfu、最も好ましくは約 $10^8$  pfuから $10^9$  pfuで投与する。複数のベクターを組み合わせで投与する場合には、それぞれを上記の量で投与するとよい。投与は1箇所または複数箇所（2, 3, 4, 5～10箇所）に投与してよい。エクスピボ投与の場合は、体外（例えば試験管またはシャーレ内）で患者から取り出した細胞などにベクターを接触させる。MOIは1～500の間で投与することが好ましく、より好ましくは2～300、さらに好ましくは3～200である。その後、細胞を患者に注入する。本発明のベクターを含む組成物の投与対象としては、ヒト、およびサル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなど全ての非ヒト哺乳動物が含まれる。

#### 【0035】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、本明細書の一部として組み込まれる。

#### 【0036】

##### 【実施例1】 培養破骨細胞形成に与えるRaf阻害薬の影響

##### 1. ラット骨髓由来マクロファージの分離培養

ラット骨髓由来マクロファージはマクロファージコロニー刺激因子 (Macrophage colony stimulating factor: M-CSF) を用いて分離培養した。8頭のチャールズリバーグレードLewisラット（6週齢、KBTオリエンタル、鳥栖、佐賀）を用い、麻酔下に頸椎脱臼により犠牲死させ、頸動脈を切断し脱血した。無菌下に両側の大腿骨及び脛骨の骨幹部を摘出、培養液（ $\alpha$ -modified essential medium:  $\alpha$ -MEM (GIBCO BRL, Rockville, Maryland, USA)) を骨髓腔に注入し骨髓細胞を採

取した。0.727%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -0.017% Tris-Cl (pH7.2)-phosphate buffered saline (PBS) 溶液を用いて赤血球を洗浄後、10%仔牛血清 (fetal bovine serum: FBS)、リコンビナントヒトM-CSF (recombinant human M-CSF: rhM-CSF, 10 ng/ml, CHEMICON International, Inc. Temecula, CA) 含有  $\alpha$ -MEMを用い180 mlフラスコに  $5 \times 10^6$  個撒いた。3日後、PBSにて洗浄し、0.05% trypsin/0.02% EDTA含有PBSで接着細胞を剥がし、180 mlフラスコに  $10^6$  個撒いた。3日後、同様の方法で細胞を回収し液体窒素中に保存した。この方法で分離したラット骨髓由来マクロファージをM-CSF依存ラット骨髓マクロファージ (M-CSF-dependent bone marrow macrophages: MDBM) と定義した。

### 【0037】

#### 2. 破骨細胞形成に与えるRaf阻害薬の影響

予め調整した10% FBS、rhM-CSF (10 ng/ml)、recombinant human soluble receptor activator of nucleus factor- $\kappa$ B ligand (sRANKL, 50 ng/ml, Pepr oTech EC, Ltd. London, U.K.)、及びrecombinant human FGF basic (rhFGF-2, 10ng/ml, Genzyme/Techne, Minneapolis, MN, USA) 含有  $\alpha$ -MEMを用い、96穴プレートにMDBMを  $5 \times 10^3$  個/wellで撒いた。接着後、dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解したRaf阻害薬 (Raf-1 Kinase Inhibitor I, Calbiochem, San Diego, CA, USA) を添加した ( $10 \mu\text{l}$ /well)。コントロール群にはDMSOのみを同量添加した。3日後に培養液を交換し、再度Raf阻害薬を添加した。培養開始より7日目にleukocyte acid phosphatase kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)を用いて酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) 染色を施行、TRAP陽性の3核以上を有する多核巨細胞を破骨細胞と定義し形成破骨細胞数を比較検討した。その結果、Raf阻害薬投与により濃度依存的に破骨細胞形成が抑制され、いずれの濃度においてもコントロールとの有意差が認められた (図1)。

### 【0038】

〔実施例2〕 AIAに与えるsFGFR遺伝子導入の影響: FGF-2細胞外遮断  
〈方法〉

#### 1. AIAモデル



AIAは、結核菌の死菌 (Mycobacterium Butyricum Desiccated: MBD, Difco, Detroit, MI, USA) 1 mgを鉱物油 (NACALAI TESQUE, 京都) 100  $\mu$ lに懸濁し、ラットの尾根部に皮下投与した。

## 2. FGF-2細胞外遮断実験プロトコール

組換えセンダイウイルスベクター (recombinant Sendai virus vector: SeV) を用いたラットへの直接的遺伝子導入法により炎症局所で標的遺伝子を発現させ、関節炎に与える影響を検討した。具体的には、関節炎の発症を確認し、アジュバント投与後14日目にAIA+sFGFR群 (n=40足) では可溶性FGFレセプター遺伝子 (soluble FGF receptor: sFGFR, 配列番号: 1) 搭載SeV (SeV-sFGFR) を、対照群のAIA+luciferase群 (n=28足) ではホタルルシフェラーゼ遺伝子搭載 (SeV-luciferase) をそれぞれ $10^8$  pfu/足でフットパッドに投与した。

## 3. 後肢容積の測定

関節炎による後肢腫脹を定量化する目的でボリュームメーター (MK-550; 室町器械、東京) を用いて後肢容積 (hind paw volume: hpv) を経時的に測定した。

## 4. レントゲン学的骨・関節破壊の評価

レントゲン学的骨・関節破壊を検討する目的で、Day21およびDay28でラットを犠牲死させ、下腿の中央部で後肢を切断し軟線撮影 (CMB-2; ソフテックス社、東京) を施行し、レントゲン学的骨・関節破壊の程度を5段階に分類し評価した。本実施例のレントゲン学的骨・関節破壊指数 (Radiological Index: RI) は以下の通りである。(0: 所見なし、1: 軽度の骨萎縮及び軟部陰影の腫脹、2: 関節裂隙の狭小化及び中等度の骨萎縮、3: 骨・軟骨ビランまたは中等度の関節破壊、4: 高度の骨破壊による関節構造の消失)。

【0039】

〈結果〉

図2Aに経時的後肢容積を示す。Day21における後肢容積はAIA+sFGFR群が $3.06 \pm 0.1$ 、AIA+luciferase群が $3.93 \pm 0.11$  ml、Day28においてはAIA+sFGFR群が $2.85 \pm 0.1$ 、AIA+luciferase群が $3.29 \pm 0.12$  mlであり、いずれの時点においてもsFGFR遺伝子導入によるFGF-2細胞外シグナル遮断により後肢腫脹が有意に抑制された。

。

図2BにDay14からDay21における容積変化率を示す。その結果、AIA+sFGFR群が $0.18 \pm 0.07$ 、AIA+luciferase群が $0.86 \pm 0.09$ mlであり、ペクター投与後7日における容積変化率においてもFGF-2細胞外シグナル遮断により有意に抑制された。

図2Cにレントゲン学的骨・関節破壊指数を示す。Day21ではAIA+sFGFR群が $1.42 \pm 0.29$  (n=12足)、AIA+luciferase群が $1.9 \pm 0.28$  (n=10足)、Day28ではAIA+sFGFR群が $1.27 \pm 0.18$  (n=26足)、AIA+luciferase群が $3.0 \pm 0.21$  (n=14足)であり、Day28においてFGF-2細胞外シグナル遮断により骨・関節破壊が有意に抑制された。

### 【0040】

〔実施例3〕 AIAに与えるspry2遺伝子導入の影響： FGF-2細胞内シグナル遮断

#### 〈方法〉

##### 1. AIAモデル

結核菌の死菌 (Mycobacterium Butyricum Desiccated: MBD, Difco) 1 mgを鉱物油 (NACALAI TESQUE) 100  $\mu$ lに懸濁し、ラットの尾根部に皮下投与した。

##### 2. FGF-2細胞内遮断実験プロトコール

組換えセンダイウイルスベクター (recombinant Sendai virus vector: SeV) を用いたラットへの直接的遺伝子導入法により炎症局所で標的遺伝子を発現させ、関節炎に与える影響を検討した。具体的には、関節炎の発症を確認し、アジュバント投与後14日目にAIA+spry2群 (n=33足) ではhuman sprouty2遺伝子 (spry2; 配列番号: 3) 搭載SeV (SeV-spry2) を、対照群のAIA+luciferase群 (n=33足) ではホタルルシフェラーゼ遺伝子搭載SeV (SeV-luciferase) をそれぞれ $10^8$  pfu/足でフットパッドに投与した。

##### 3. 後肢容積の測定

関節炎による後肢腫脹を定量化する目的でボリュームメーター (MK-550; 室町器械) を用いて後肢容積 (hind paw volume: hpv) を経時的に測定した。

##### 4. レントゲン学的骨・関節破壊の評価

レントゲン学的骨・関節破壊を検討する目的で、Day21およびDay28でラットを犠牲死させ、下腿の中央部で後肢を切断し軟線撮影 (CMB-2; ソフテックス社)

を施行し、レントゲン学的骨・関節破壊の程度を5段階に分類し評価した。本実施例のレントゲン学的骨・関節破壊指数 (Radiological Index: RI) は以下の通りである。(0: 所見なし、1: 軽度の骨萎縮及び軟部陰影の腫脹、2: 関節裂隙の狭小化及び中等度の骨萎縮、3: 骨・軟骨ビランまたは中等度の関節破壊、4: 高度の骨破壊による関節構造の消失)。

#### 【0041】

##### 〈結果〉

図3Aに経時的後肢容積を示す。Day21における後肢容積はAIA+spry2群が $3.33 \pm 0.1$ 、AIA+luciferase群が $3.85 \pm 0.12$  ml、Day28においてはAIA+spry2群が $3.07 \pm 0.12$ 、AIA+luciferase群が $3.38 \pm 0.16$  mlであり、いずれの時点においてもspry2遺伝子導入によるFGFR1/Ras/Raf/MAPKを介したFGF-2細胞内シグナル遮断により後肢腫脹が有意に抑制された。

図3BにDay14からDay21における容積変化率を示す。その結果、AIA+spry2群が $0.21 \pm 0.07$ 、AIA+luciferase群が $0.77 \pm 0.08$  mlであり、ベクター投与後7日における容積変化率においてもFGF-2細胞内シグナル遮断により後肢腫脹が有意に抑制された。

図3Cにレントゲン学的骨・関節破壊指数を示す。Day21ではAIA+spry2群が $1.36 \pm 0.20$  (n=11足)、AIA+luciferase群が $2.27 \pm 0.33$  (n=11足)、Day28ではAIA+spry2群が $1.82 \pm 0.19$  (n=22足)、AIA+luciferase群が $3.0 \pm 0.28$  (n=22足)であり、いずれの時点においてもFGF-2細胞内シグナル遮断により骨・関節破壊が有意に抑制された。

#### 【0042】

##### 【発明の効果】

本発明により、「FGF2の機能阻害またはそのシグナル伝達経路の阻害」という概念のもとより疾患特異的かつ有効で更により安全な生物学的創薬が可能となる。また、RA治療戦略において血管新生因子FGF2分子を標的とすることで、関節炎症の抑制のみならず、病期進展の抑制、更に骨破壊に至らないようにする有効な治療法が確立される。

#### 【0043】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC RESEARCH INC.

<120> Method for treating inflammatory diseases associated with bone de  
struction

<130> D3-A0206

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 900

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(900)

<223>

<400> 1

atg tgg agc tgg aag tgc ctc ctc ttc tgg gct gtg ctg gtc aca gcc 48

Met Trp Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala

1

5

10

15

aca ctc tgc acc gct agg ccg tcc ccg acc ttg cct gaa caa gat gct	96
Thr Leu Cys Thr Ala Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Asp Ala	
20 25 30	
ctc ccc tcc tcg gag gat gat gat gat gat gac tcc tct tca gag	144
Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Ser Ser Ser Glu	
35 40 45	
gag aaa gaa aca gat aac acc aaa cca aac ccc gta gct cca tat tgg	192
Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp	
50 55 60	
aca tcc cca gaa aag atg gaa aag aaa ttg cat gca gtg ccg gct gcc	240
Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala	
65 70 75 80	
aag aca gtg aag ttc aaa tgc cct tcc agt ggg acc cca aac ccc aca	288
Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr	
85 90 95	
ctg cgc tgg ttg aaa aat ggc aaa gaa ttc aaa cct gac cac aga att	336
Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile	
100 105 110	
gga ggc tac aag gtc cgt tat gcc acc tgg agc atc ata atg gac tct	384
Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser	
115 120 125	
gtg gtg ccc tct gac aag ggc aac tac acc tgc att gtg gag aat gag	432

Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu	
130 135 140	
tac ggc agc atc aac cac aca tac cag ctg gat gtc gtg gag cgg tcc	480
Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu Arg Ser	
145 150 155 160	
cct cac cgg ccc atc ctg caa gca ggg ttg ccc gcc aac aaa aca gtg	528
Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Lys Thr Val	
165 170 175	
gcc ctg ggt agc aac gtg gag ttc atg tgt aag gtg tac agt gac ccg	576
Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro	
180 185 190	
cag ccg cac atc cag tgg cta aag cac atc gag gtg aat ggg agc aag	624
Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys	
195 200 205	
att ggc cca gac aac ctg cct tat gtc cag atc ttg aag gta atc atg	672
Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro Tyr Val Gln Ile Leu Lys Val Ile Met	
210 215 220	
gca cca gtc ttc gtg ggc cag tct act ggg aag gag acc act gtc tcg	720
Ala Pro Val Phe Val Gly Gln Ser Thr Gly Lys Glu Thr Thr Val Ser	
225 230 235 240	
ggg gct caa gtt cct gtg ggc agg ctc agt tgc ccc cga atg gga tca	768
Gly Ala Gln Val Pro Val Gly Arg Leu Ser Cys Pro Arg Met Gly Ser	

245

250

255

ttc ctc acg ctt cag gca cac aca ctc cat ctc agt agg gat cta gcc 816

Phe Leu Thr Leu Gln Ala His Thr Leu His Leu Ser Arg Asp Leu Ala

260

265

270

aca tcc ccc agg act agt aac aga ggt cac aaa gtg gag gtg agc tgg 864

Thr Ser Pro Arg Thr Ser Asn Arg Gly His Lys Val Glu Val Ser Trp

275

280

285

gaa cag agg gct gca ggg atg ggt ggt gct ggt ctg 900

Glu Gln Arg Ala Ala Gly Met Gly Gly Ala Gly Leu

290

295

300

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 300

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Trp Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala

1

5

10

15

Thr Leu Cys Thr Ala Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Asp Ala

20

25

30

Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Ser Ser Ser Glu

35

40

45

Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp  
50 55 60

Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala  
65 70 75 80

Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr  
85 90 95

Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile  
100 105 110

Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser  
115 120 125

Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu  
130 135 140

Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu Arg Ser  
145 150 155 160

Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Lys Thr Val  
165 170 175

Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro  
180 185 190

Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys



195

200

205

Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro Tyr Val Gln Ile Leu Lys Val Ile Met

210

215

220

Ala Pro Val Phe Val Gly Gln Ser Thr Gly Lys Glu Thr Thr Val Ser

225

230

235

240

Gly Ala Gln Val Pro Val Gly Arg Leu Ser Cys Pro Arg Met Gly Ser

245

250

255

Phe Leu Thr Leu Gln Ala His Thr Leu His Leu Ser Arg Asp Leu Ala

260

265

270

Thr Ser Pro Arg Thr Ser Asn Arg Gly His Lys Val Glu Val Ser Trp

275

280

285

Glu Gln Arg Ala Ala Gly Met Gly Gly Ala Gly Leu

290

295

300

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 945

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(945)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 3

atg gag gcc aga gct cag agt ggc aac ggg tcg cag ccc ttg ctg cag 48  
 Met Glu Ala Arg Ala Gln Ser Gly Asn Gly Ser Gln Pro Leu Leu Gln  
 1 5 10 15

acg ccc cgt gac ggt ggc aga cag cgt ggg gag ccc gac ccc aga gac 96  
 Thr Pro Arg Asp Gly Gly Arg Gln Arg Gly Glu Pro Asp Pro Arg Asp  
 20 25 30

gcc ctc acc cag cag gta cat gtc ttg tct ctg gat cag atc aga gcc 144  
 Ala Leu Thr Gln Gln Val His Val Leu Ser Leu Asp Gln Ile Arg Ala  
 35 40 45

atc cga aac acc aat gag tac aca gag ggg cct act gtc gtc cca aga 192  
 Ile Arg Asn Thr Asn Glu Tyr Thr Glu Gly Pro Thr Val Val Pro Arg  
 50 55 60

cct ggg ctc aag cct gct cct cgc ccc tcc act cag cac aaa cac gag 240  
 Pro Gly Leu Lys Pro Ala Pro Arg Pro Ser Thr Gln His Lys His Glu  
 65 70 75 80

aga ctc cac ggt ctg cct gag cac cgc cag cct cct agg ctc cag cac 288  
 Arg Leu His Gly Leu Pro Glu His Arg Gln Pro Pro Arg Leu Gln His  
 85 90 95

tcg cag gtc cat tct tct gca cga gcc cct ctg tcc aga tcc ata agc 336  
 Ser Gln Val His Ser Ser Ala Arg Ala Pro Leu Ser Arg Ser Ile Ser

100	105	110	
acg gtc agc tca ggg tcg cgg agc agt acg agg aca agt acc agc agc			384
Thr Val Ser Ser Gly Ser Arg Ser Ser Thr Arg Thr Ser Thr Ser Ser			
115	120	125	
agc tcc tct gaa cag aga ctg cta gga tca tcc ttc tcc tcc ggg cct			432
Ser Ser Ser Glu Gln Arg Leu Leu Gly Ser Ser Phe Ser Ser Gly Pro			
130	135	140	
gtt gct gat ggc ata atc cgg gtg caa ccc aaa tct gag ctc aag cca			480
Val Ala Asp Gly Ile Ile Arg Val Gln Pro Lys Ser Glu Leu Lys Pro			
145	150	155	160
ggt gag ctt aag cca ctg agc aag gaa gat ttg ggc ctg cac gcc tac			528
Gly Glu Leu Lys Pro Leu Ser Lys Glu Asp Leu Gly Leu His Ala Tyr			
165	170	175	
agg tgt gag gac tgt ggc aag tgc aaa tgt aag gag tgc acc tac cca			576
Arg Cys Glu Asp Cys Gly Lys Cys Lys Cys Lys Glu Cys Thr Tyr Pro			
180	185	190	
agg cct ctg cca tca gac tgg atc tgc gac aag cag tgc ctt tgc tcg			624
Arg Pro Leu Pro Ser Asp Trp Ile Cys Asp Lys Gln Cys Leu Cys Ser			
195	200	205	
gcc cag aac gtg att gac tat ggg act tgt gta tgc tgt gtg aaa ggt			672
Ala Gln Asn Val Ile Asp Tyr Gly Thr Cys Val Cys Cys Val Lys Gly			
210	215	220	

ctc ttc tat cac tgt tct aat gat gat gag gac aac tgt gct gac aac 720  
 Leu Phe Tyr His Cys Ser Asn Asp Asp Glu Asp Asn Cys Ala Asp Asn  
 225 230 235 240

cca tgt tct tgc agc cag tct cac tgt tgt aca cga tgg tca gcc atg 768  
 Pro Cys Ser Cys Ser Gln Ser His Cys Cys Thr Arg Trp Ser Ala Met  
 245 250 255

ggc gtc atg tcc ctc ttt ttg cct tgt tta tgg tgt tac ctt cca gcc 816  
 Gly Val Met Ser Leu Phe Leu Pro Cys Leu Trp Cys Tyr Leu Pro Ala  
 260 265 270

aag ggt tgc ctt aaa ttg tgc cag ggg tgt tat gac cgg gtt aac agg 864  
 Lys Gly Cys Leu Lys Leu Cys Gln Gly Cys Tyr Asp Arg Val Asn Arg  
 275 280 285

cct ggt tgc cgc tgt aaa aac tca aac aca gtt tgc tgc aaa gtt ccc 912  
 Pro Gly Cys Arg Cys Lys Asn Ser Asn Thr Val Cys Cys Lys Val Pro  
 290 295 300

act gtc ccc cct agg aac ttt gaa aaa cca aca 945  
 Thr Val Pro Pro Arg Asn Phe Glu Lys Pro Thr  
 305 310 315

<210> 4

<211> 315

<212> PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met Glu Ala Arg Ala Gln Ser Gly Asn Gly Ser Gln Pro Leu Leu Gln  
1 5 10 15

Thr Pro Arg Asp Gly Gly Arg Gln Arg Gly Glu Pro Asp Pro Arg Asp  
20 25 30

Ala Leu Thr Gln Gln Val His Val Leu Ser Leu Asp Gln Ile Arg Ala  
35 40 45

Ile Arg Asn Thr Asn Glu Tyr Thr Glu Gly Pro Thr Val Val Pro Arg  
50 55 60

Pro Gly Leu Lys Pro Ala Pro Arg Pro Ser Thr Gln His Lys His Glu  
65 70 75 80

Arg Leu His Gly Leu Pro Glu His Arg Gln Pro Pro Arg Leu Gln His  
85 90 95

Ser Gln Val His Ser Ser Ala Arg Ala Pro Leu Ser Arg Ser Ile Ser  
100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Ser Arg Ser Ser Thr Arg Thr Ser Thr Ser Ser  
115 120 125

Ser Ser Ser Glu Gln Arg Leu Leu Gly Ser Ser Phe Ser Ser Gly Pro

130

135

140

Val Ala Asp Gly Ile Ile Arg Val Gln Pro Lys Ser Glu Leu Lys Pro

145

150

155

160

Gly Glu Leu Lys Pro Leu Ser Lys Glu Asp Leu Gly Leu His Ala Tyr

165

170

175

Arg Cys Glu Asp Cys Gly Lys Cys Lys Cys Lys Glu Cys Thr Tyr Pro

180

185

190

Arg Pro Leu Pro Ser Asp Trp Ile Cys Asp Lys Gln Cys Leu Cys Ser

195

200

205

Ala Gln Asn Val Ile Asp Tyr Gly Thr Cys Val Cys Cys Val Lys Gly

210

215

220

Leu Phe Tyr His Cys Ser Asn Asp Asp Glu Asp Asn Cys Ala Asp Asn

225

230

235

240

Pro Cys Ser Cys Ser Gln Ser His Cys Cys Thr Arg Trp Ser Ala Met

245

250

255

Gly Val Met Ser Leu Phe Leu Pro Cys Leu Trp Cys Tyr Leu Pro Ala

260

265

270

Lys Gly Cys Leu Lys Leu Cys Gln Gly Cys Tyr Asp Arg Val Asn Arg

275

280

285

Pro Gly Cys Arg Cys Lys Asn Ser Asn Thr Val Cys Cys Lys Val Pro  
 290 295 300

Thr Val Pro Pro Arg Asn Phe Glu Lys Pro Thr  
 305 310 315

<210> 5

<211> 1230

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1230)

<223>

<400> 5

atg acc gaa gaa aca cac ccg gac gat gac agc tat att gtg cgt gtc 48  
 Met Thr Glu Glu Thr His Pro Asp Asp Asp Ser Tyr Ile Val Arg Val  
 1 5 10 15

aag gct gtg gtt atg acc aga gat gac tcc agc ggg gga tgg ttc cca 96  
 Lys Ala Val Val Met Thr Arg Asp Asp Ser Ser Gly Gly Trp Phe Pro  
 20 25 30

cag gaa gga ggc ggg atc agt cgc gtc ggc gtg tgt aag gtc atg cac 144  
 Gln Glu Gly Gly Gly Ile Ser Arg Val Gly Val Cys Lys Val Met His  
 35 40 45

cct gaa ggc aac gga cga agc ggc ttt ctc atc cat ggc gag cga cag	192
Pro Glu Gly Asn Gly Arg Ser Gly Phe Leu Ile His Gly Glu Arg Gln	
50 55 60	
aaa gac aaa ctg gtg gta ttg gaa tgc tat gtc aga aag gac ttg gtc	240
Lys Asp Lys Leu Val Val Leu Glu Cys Tyr Val Arg Lys Asp Leu Val	
65 70 75 80	
tac acc aaa gcc aat ccg acg ttt cat cat tgg aag gtt gat aac agg	288
Tyr Thr Lys Ala Asn Pro Thr Phe His His Trp Lys Val Asp Asn Arg	
85 90 95	
aag ttt gga ctt act ttc caa agt cct gca gat gca cga gcc ttt gac	336
Lys Phe Gly Leu Thr Phe Gln Ser Pro Ala Asp Ala Arg Ala Phe Asp	
100 105 110	
agg ggc gtg aga aaa gcc att gaa gac ctt ata gaa ggt tca acg acc	384
Arg Gly Val Arg Lys Ala Ile Glu Asp Leu Ile Glu Gly Ser Thr Thr	
115 120 125	
tcc tct tcc act ctc cat aac gaa gct gag ctc gga gac gat gac gtt	432
Ser Ser Ser Thr Leu His Asn Glu Ala Glu Leu Gly Asp Asp Asp Val	
130 135 140	
ttc acg aca gct acg gac agt tct tct aat tcc tcg cag aag agg gag	480
Phe Thr Thr Ala Thr Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ser Gln Lys Arg Glu	
145 150 155 160	



ccg act acg agg aca atc tcc tcc ccc acg tcc tgt gag cac cgg aag	528
Pro Thr Thr Arg Thr Ile Ser Ser Pro Thr Ser Cys Glu His Arg Lys	
165 170 175	
att tat acc ctt gac cca tac ccc atg gac cat tac cac cct gac cag	576
Ile Tyr Thr Leu Asp Pro Tyr Pro Met Asp His Tyr His Pro Asp Gln	
180 185 190	
cgg ttg ccg cgg tcc tac ccc cag gtc acc ttc cca gaa gat gat gaa	624
Arg Leu Pro Arg Ser Tyr Pro Gln Val Thr Phe Pro Glu Asp Asp Glu	
195 200 205	
gaa att gta cgc atc aac ccc cga gag aag atc tgg atg acc ggt tat	672
Glu Ile Val Arg Ile Asn Pro Arg Glu Lys Ile Trp Met Thr Gly Tyr	
210 215 220	
gaa gac tac cgg cac gcg ccg gtt cgc ggc aaa tac tta gac acc aca	720
Glu Asp Tyr Arg His Ala Pro Val Arg Gly Lys Tyr Leu Asp Thr Thr	
225 230 235 240	
gaa gac gcg gac tcc tac gtg cgc ttc gcc aag ggc gaa gtc ccc aaa	768
Glu Asp Ala Asp Ser Tyr Val Arg Phe Ala Lys Gly Glu Val Pro Lys	
245 250 255	
cac gaa tat acc tat ccc tat gtt gat tct tcg gac ttc ggc ttc ggg	816
His Glu Tyr Thr Tyr Pro Tyr Val Asp Ser Ser Asp Phe Gly Phe Gly	
260 265 270	
gag gat ccc aaa ggt agt gtg atc aag aca cag ccg ccc agg gcc aag	864

Glu Asp Pro Lys Gly Ser Val Ile Lys Thr Gln Pro Pro Arg Ala Lys  
 275 280 285

tcc cgt cgg cgg aag gag aac ggc gaa cgg tcg cgg tgt gtg tac tgc 912  
 Ser Arg Arg Arg Lys Glu Asn Gly Glu Arg Ser Arg Cys Val Tyr Cys  
 290 295 300

agg gat atg ttt aat cac gaa gag aac cga agg ggc cac tgc caa gac 960  
 Arg Asp Met Phe Asn His Glu Glu Asn Arg Arg Gly His Cys Gln Asp  
 305 310 315 320

gcg ccc gac gcc gtg aga act tgc att cgc cgg gtg agc tgt atg tgg 1008  
 Ala Pro Asp Ala Val Arg Thr Cys Ile Arg Arg Val Ser Cys Met Trp  
 325 330 335

tgc gcg gac agc atg ctg tac cac tgt atg tcc gac ccc gag gga gac 1056  
 Cys Ala Asp Ser Met Leu Tyr His Cys Met Ser Asp Pro Glu Gly Asp  
 340 345 350

tac act gac cct tgt tcg tgt gac aca agc gat gag aag ttt tgc ctc 1104  
 Tyr Thr Asp Pro Cys Ser Cys Asp Thr Ser Asp Glu Lys Phe Cys Leu  
 355 360 365

cgg tgg atg gct cta att gcc ttg tct ttc ctg gcc cct tgt atg tgc 1152  
 Arg Trp Met Ala Leu Ile Ala Leu Ser Phe Leu Ala Pro Cys Met Cys  
 370 375 380

tgt tac ctg ccc ctc cgg gcc tgc cac cgc tgt gga gtg atg tgc agg 1200  
 Cys Tyr Leu Pro Leu Arg Ala Cys His Arg Cys Gly Val Met Cys Arg

385

390

395

400

tgc tgt ggt ggg aag cac aaa gcc gcc gcg

1230

Cys Cys Gly Gly Lys His Lys Ala Ala Ala

405

410

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 410

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 6

Met Thr Glu Glu Thr His Pro Asp Asp Asp Ser Tyr Ile Val Arg Val

1

5

10

15

Lys Ala Val Val Met Thr Arg Asp Asp Ser Ser Gly Gly Trp Phe Pro

20

25

30

Gln Glu Gly Gly Gly Ile Ser Arg Val Gly Val Cys Lys Val Met His

35

40

45

Pro Glu Gly Asn Gly Arg Ser Gly Phe Leu Ile His Gly Glu Arg Gln

50

55

60

Lys Asp Lys Leu Val Val Leu Glu Cys Tyr Val Arg Lys Asp Leu Val

65

70

75

80

Tyr Thr Lys Ala Asn Pro Thr Phe His His Trp Lys Val Asp Asn Arg  
85 90 95

Lys Phe Gly Leu Thr Phe Gln Ser Pro Ala Asp Ala Arg Ala Phe Asp  
100 105 110

Arg Gly Val Arg Lys Ala Ile Glu Asp Leu Ile Glu Gly Ser Thr Thr  
115 120 125

Ser Ser Ser Thr Leu His Asn Glu Ala Glu Leu Gly Asp Asp Asp Val  
130 135 140

Phe Thr Thr Ala Thr Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ser Gln Lys Arg Glu  
145 150 155 160

Pro Thr Thr Arg Thr Ile Ser Ser Pro Thr Ser Cys Glu His Arg Lys  
165 170 175

Ile Tyr Thr Leu Asp Pro Tyr Pro Met Asp His Tyr His Pro Asp Gln  
180 185 190

Arg Leu Pro Arg Ser Tyr Pro Gln Val Thr Phe Pro Glu Asp Asp Glu  
195 200 205

Glu Ile Val Arg Ile Asn Pro Arg Glu Lys Ile Trp Met Thr Gly Tyr  
210 215 220

Glu Asp Tyr Arg His Ala Pro Val Arg Gly Lys Tyr Leu Asp Thr Thr  
225 230 235 240

Glu Asp Ala Asp Ser Tyr Val Arg Phe Ala Lys Gly Glu Val Pro Lys  
245 250 255

His Glu Tyr Thr Tyr Pro Tyr Val Asp Ser Ser Asp Phe Gly Phe Gly  
260 265 270

Glu Asp Pro Lys Gly Ser Val Ile Lys Thr Gln Pro Pro Arg Ala Lys  
275 280 285

Ser Arg Arg Arg Lys Glu Asn Gly Glu Arg Ser Arg Cys Val Tyr Cys  
290 295 300

Arg Asp Met Phe Asn His Glu Glu Asn Arg Arg Gly His Cys Gln Asp  
305 310 315 320

Ala Pro Asp Ala Val Arg Thr Cys Ile Arg Arg Val Ser Cys Met Trp  
325 330 335

Cys Ala Asp Ser Met Leu Tyr His Cys Met Ser Asp Pro Glu Gly Asp  
340 345 350

Tyr Thr Asp Pro Cys Ser Cys Asp Thr Ser Asp Glu Lys Phe Cys Leu  
355 360 365

Arg Trp Met Ala Leu Ile Ala Leu Ser Phe Leu Ala Pro Cys Met Cys  
370 375 380

Cys Tyr Leu Pro Leu Arg Ala Cys His Arg Cys Gly Val Met Cys Arg

385

390

395

400

Cys Cys Gly Gly Lys His Lys Ala Ala Ala

405

410

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

Raf阻害薬投与による破骨細胞形成の抑制を示す図である。結果は平均 ± 標準偏差で表した。統計学的解析はone-way ANOVAを用い、\*危険率 $p < 0.01$ で有意差ありと判定した。(n=各 8 培養群 (culture groups))。

## 【図 2】

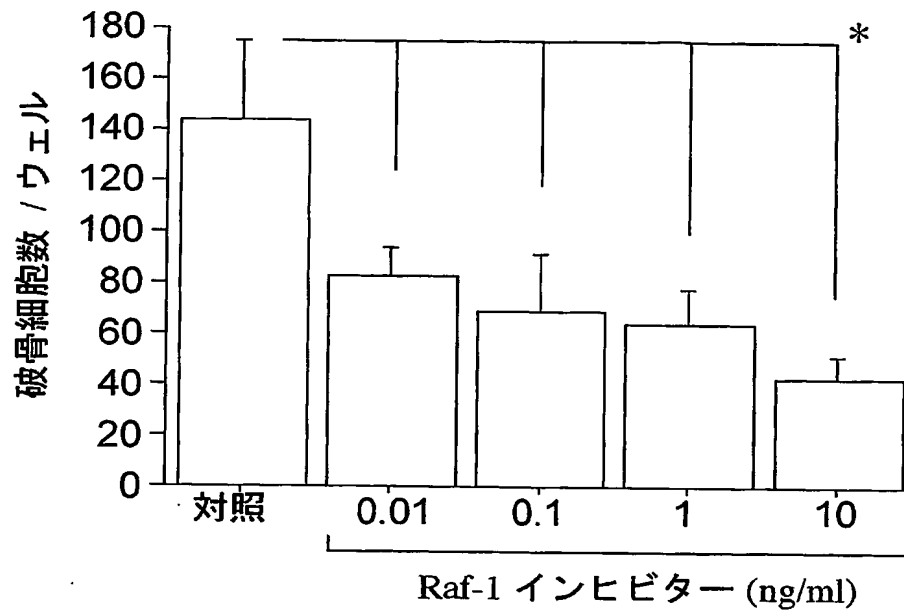
sFGFR遺伝子導入によるAIA治療効果を示す図である。図中、ベクターのインジェクションは標的遺伝子を搭載したSeVをフットパッド投与した時点を示す。結果は平均 ± 標準誤差で表した。統計学的解析はMann-Whitney U-testを用い、\*危険率 $p < 0.01$ で有意差ありと判定した。

## 【図 3】

spry2遺伝子導入によるAIA治療効果を示す図である。図中、ベクターインジェクションは標的遺伝子を搭載したSeVをフットパッド投与した時点を示す。結果は平均 ± 標準誤差で表した。統計学的解析はMann-Whitney U-testを用い、#危険率 $p < 0.05$ 、または\*危険率 $p < 0.01$ で有意差ありと判定した。

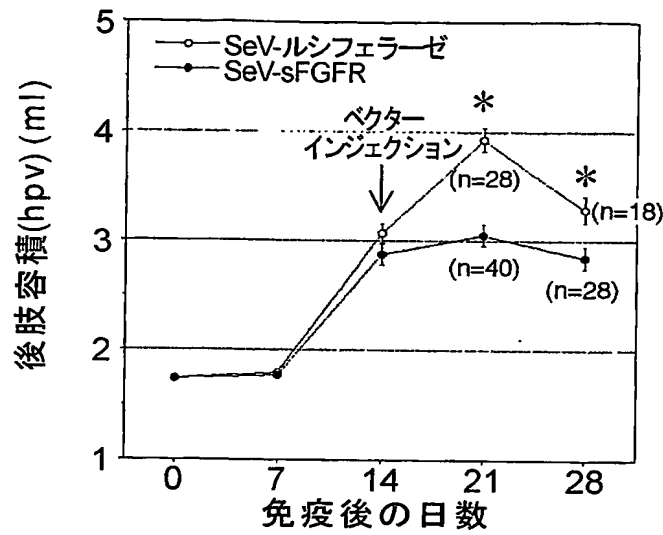
【書類名】 図面

【図 1】

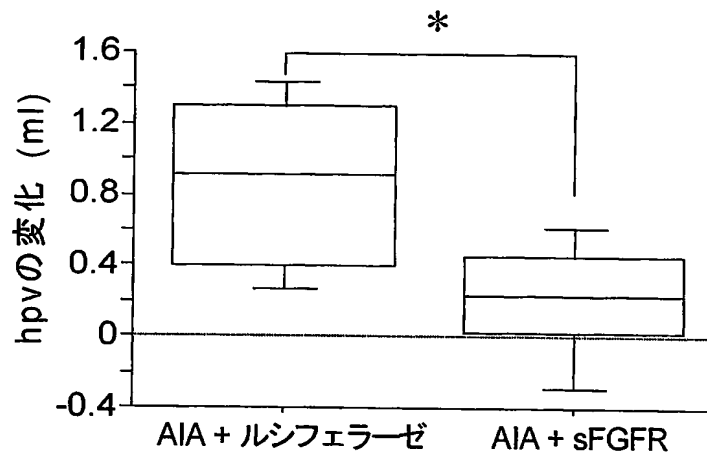


【図2】

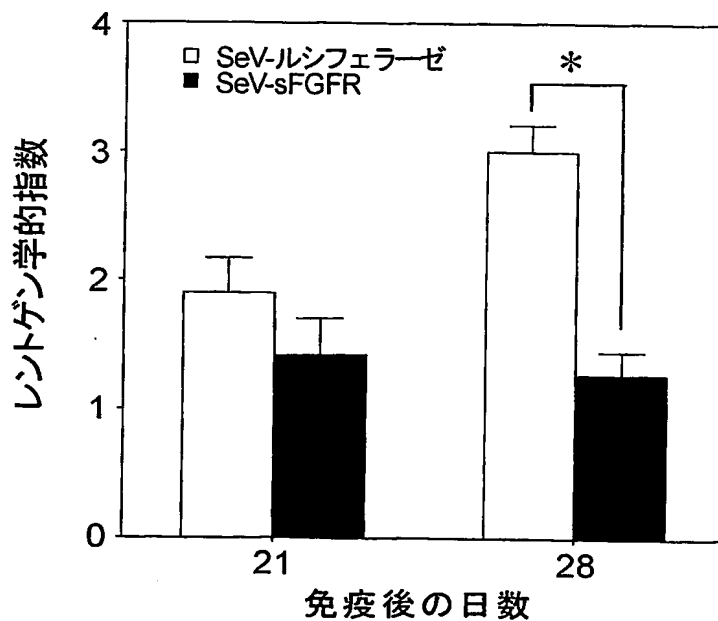
A



B

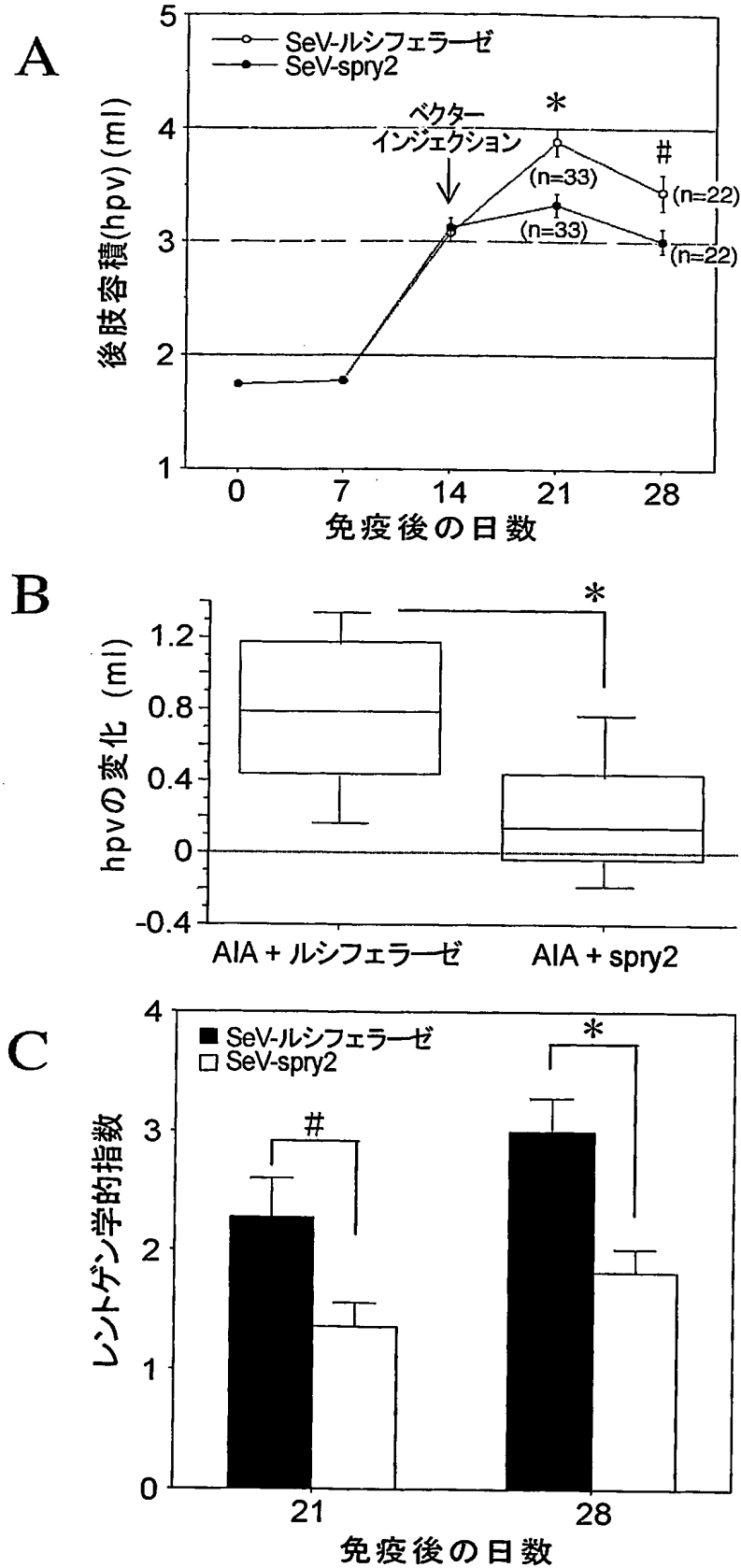


C





【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は骨破壊を伴う炎症性疾患の治療方法を提供する。

【解決手段】 本発明は、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF2)－FGF受容体1－Ras－Raf－MAPキナーゼを介するシグナル伝達を阻害する遺伝子を有するウイルスベクターを疾患部位に投与する工程を含む、骨破壊を伴う炎症性疾患の治療方法に関する。また本発明は、該ベクターを含む、骨破壊を伴う炎症性疾患の治療組成物に関する。ウイルスベクターの局所投与を介してFGF2のシグナル伝達を阻害することにより、炎症性骨破壊における炎症と骨破壊の両方を同時に抑制することに成功した。本発明は、これまで治療が困難であった関節リウマチ等の炎症性骨疾患に対する、疾患特異的かつ効果的な治療方法、および治療組成物を提供する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 7 5 9 6 4

ページ : 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 5 1 5 5 1 0 7 ]

1. 変更年月日

1 9 9 5 年 1 1 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市観音台1丁目25番11号

氏 名

株式会社ダイナベック研究所